

Artículo Original/ Original Article

Caracterización del perfil antigénico de extractos proteicos solubles de cepas de *Trypanosoma cruzi*

Ana María Martínez-Pavetti¹, Belén Infanzón², Alejandra Rojas², Laura Aria², Liz López², Teresa Meza², Ivalena de Guillen², *María Eugenia Acosta de Hetter²

1. Estudiante de Bioquímica Clínica (Plan 3), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay
2. Departamento de Producción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

Cómo referenciar este artículo/ How to reference this article:

Martínez-Pavetti AM, Infanzón B, Rojas A, Aria L, López L, Meza T, et al. Caracterización del perfil antigénico de extractos proteicos solubles de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2017; 15(3): 27-34

RESUMEN

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. El mismo presenta una amplia diversidad biológica y genética, por lo cual se lo agrupa en 6 unidades taxonómicas discretas. Las cepas Y, CL Brener y una aislada en Paraguay aún no caracterizada en su totalidad fueron empleadas en este estudio con el fin de determinar sus perfiles proteico y antigénico para aportar en la investigación sobre esta enfermedad en nuestro país, aplicando técnicas como SDS-PAGE, ELISA y *Western blot*. Se observaron semejanzas en los perfiles proteicos de los extractos solubles de Y Lote 73 e Y Lote 74, siendo ambos obtenidos a partir de la misma cepa, así como perfil diferente de éstos con los de CL Brener y Py. Se detectaron bandas de proteínas de pesos moleculares comunes entre extractos, principalmente las consideradas de bajo peso molecular. Se constató la capacidad antigénica al ensayar los 4 extractos frente a sueros chagásicos, no chagásicos, controles positivos y negativos, se evidenció la importancia de confirmar el diagnóstico con pruebas de principios diferentes. Además, se detectaron proteínas antigénicas comunes a los 3 extractos empleados en el *Western blot*, las que podrían ser estudiadas con mayor profundidad debido a su potencial antigénico, característica de interés para fines diagnósticos.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, western blot, enfermedad de Chagas.

Antigenic profile characterization of soluble protein extracts from two *Trypanosoma cruzi* strains

ABSTRACT

The parasite *Trypanosoma cruzi* is the causal agent of Chagas disease. It presents a wide biological and genetic diversity, therefore it is grouped into 6 taxonomic units.. The strains Y, CL Brener and one strain isolated in Paraguay were used in this study in order to determine their protein and antigenic profiles, applying techniques such as SDS-PAGE, ELISA and Western blot. Similarities were observed in the protein profiles of the soluble extracts of Lot 73 Y and Lot 74 Y both obtained from the same strain, and the different profile of these with those of CL Brener and Py strains. Protein bands of common molecular weights, mainly those considered low, were detected between extracts. By testing the four extracts against chagasic and non-chagasic sera, positive and negative controls, the antigenic capacity was verified and the importance of utilizing different test to confirm diagnosis was shown. In addition antigenic proteins common to the three extracts used in the Western blot were detected and can be further investigated due to their antigenic potential, an interesting characteristic for diagnostic purpose.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, western blot, Chagas disease.

Fecha de recepción: marzo 2017. Fecha de aceptación: junio 2017

*Autor correspondiente: **María Eugenia Acosta de Hetter**. Departamento de Producción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.
Email: maruhetter@yahoo.com.mx.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas está incluida dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas y está asociada a un nivel socioeconómico bajo, afectando principalmente a la población de escasos recursos que vive en condiciones de extrema pobreza (1).

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el parásito *Trypanosoma cruzi* que es capaz de infectar a varias especies de mamíferos incluyendo al ser humano, así como de insectos de la subfamilia Triatominae, mayoritariamente de los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (2-4). La principal vía de transmisión al ser humano es a través de la picadura del insecto infectado, mediante la introducción de los parásitos presentes en sus heces a través de la herida o las mucosas. Además, existen otras vías de transmisión, tales como las transfusiones sanguíneas, de la madre infectada al hijo durante el embarazo, y por vía oral por alimentos contaminados con *T. cruzi* (5,6).

El ciclo vital del parásito comprende cuatro estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote en el huésped mamífero. Estos estadios se diferencian de acuerdo a la posición del flagelo y del cinetoplasto, el cual es una estructura que consta de ADN propio (7).

Además de las diferentes morfologías que presenta *T. cruzi* en el transcurso de su ciclo vital, las diferentes cepas presentan una gran diversidad biológica, bioquímica y genética. Ésto ha dado lugar a la clasificación de las mismas en unidades taxonómicas discretas (UTDs), de acuerdo a marcadores moleculares, genéticos e inmunológicos. Las UTDs se definen como conjuntos de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población y son identificables por marcadores moleculares comunes, y actualmente son 6 designados como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (8,9).

Dentro del grupo TcVI se encuentra el clon CL Brener, derivado de la cepa CL, de gran importancia debido a que fue el organismo de referencia para el "Proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi*". Ya que se conocen a profundidad varios aspectos de éste clon, como por ejemplo las condiciones óptimas de cultivo y su infectividad en líneas celulares y ratones, es ampliamente empleado en estudios que involucran a *T. cruzi* (10). Otra cepa frecuentemente empleada en investigación es Ypsilon (Y), correspondiente al grupo TcII, cuyo extracto antigénico fue utilizado en la producción de kits de ELISA y el desarrollo de un test rápido inmunocromatográfico en nuestro país en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (11,12).

A nivel nacional se ha reportado la circulación de cepas correspondientes a las 6 UTDs, con lo que se evidencia la heterogeneidad de cepas de *T. cruzi* circulantes a las cuales la población vulnerable se encontraría expuesta (13).

Para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se deben tener en cuenta los aspectos clínicos, epidemiológicos y laboratoriales. Es necesario conocer en qué etapa de la infección se encuentra el paciente, ya que en la fase aguda la parasitemia es elevada y se puede realizar la observación directa del parásito en sangre periférica por medio de microscopía, así como también se lo puede detectar por medio de hemocultivo, xenodiagnóstico y métodos moleculares (6,14).

Por otro lado, en la fase crónica la carga parasitaria en sangre es escasa, por lo que se realiza la detección de los anticuerpos generados por el paciente. Se emplean ampliamente para dicho fin la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta (HI) y la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA). A pesar de los múltiples métodos empleados en la detección de la enfermedad de Chagas, no existe una técnica considerada *gold standard*, existiendo inconvenientes en las técnicas empleadas a nivel comercial por las variaciones de sensibilidad y especificidad (14,15).

Un inconveniente adicional en los países co-endémicos para *T. cruzi* y *Leishmania* spp. se relaciona con los resultados falsos positivos, debido a que ambos parásitos poseen una filogenia común muy cercana, y comparten características antigénicas (16). Es por ello que la Organización Mundial de la Salud recomienda que el diagnóstico se realice por al menos dos métodos con principio diferente, y hasta por tres métodos en casos de discordancia de resultados (17). Una alternativa a esta situación comprende el empleo de proteínas recombinantes específicas de *T. cruzi* en la elaboración de los métodos de diagnóstico, con el objetivo de aumentar la especificidad (14). Debido a la amplia variabilidad entre cepas de *T. cruzi* y las reacciones inespecíficas que se presentan con otros tripanosomátidos, sobre todo con *Leishmania* spp., es necesario conocer y comprender el perfil de antigenicidad de las cepas empleadas en los distintos métodos para poder discriminar con criterio un

resultado ambiguo, y de ser posible emplear técnicas que incluyan a las cepas circulantes de la zona. En este trabajo se realizó una caracterización del perfil antigénico de los extractos proteicos solubles de diferentes cepas de *T. cruzi*, incluyendo una cepa aislada en Paraguay y otras cepas como CL Brener e Y, con el fin de aportar información preliminar de relevancia para posteriores proyectos de investigación sobre la detección de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y extractos

Las cepas incluidas fueron épsilon (Y) (TcII), CL Brener (TCIV) y una cepa aislada en Paraguay (Py) (TcII.) (13). Se emplearon 2 extractos diferentes de la cepa Y, "Y Lote 73", constituido por parásitos de ciclo incompleto es decir mantenidos en pasajes sucesivos en medio de cultivo, y el "Y Lote 74" obtenido a partir de parásitos sometidos a un pasaje alterno vertebrado e invertebrado y amplificado en medio de cultivo constituido por parásitos de ciclo completo. También, se incluyeron extractos de ciclo incompleto de la cepa PY y cepa CL Brener. Todas las cepas fueron donadas por el Departamento de Medicina Tropical -IICS.

Los epimastigotes de *T. cruzi* en medio de cultivo LIT (Liver Infusion - Triptose) se lisaron mediante sonicación. Se re-suspendieron en solución fisiológica y se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se almacenaron a -20°C hasta procesamiento.

Perfil de Proteínas

Para la observación del patrón de proteínas de los diferentes extractos de *T. cruzi*, se realizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (18)

Funcionalidad antigénica

Western Blot

Para la inmunodetección y determinación del perfil proteico, se realizó Western Blot según el protocolo de Towbin (19). Las fracciones proteicas en el gel SDS-PAGE fueron transferidas en membranas Inmobilon-P (Millipore) usando voltaje constante de 150 volt a 4°C.

Se utilizaron paneles de sueros de pacientes debidamente codificados y almacenados en la seroteca del IICS correspondiendo a muestras anonimizadas que previamente fueron analizadas por otros métodos serológico comerciales y por el Kit de ELISA Chagas IICS versión 1(IICS-UNA).

Para determinar el perfil de cada antígeno frente a los anticuerpos de tipo IgG en los sueros se preparó una dilución 1/20 en tampón TBS leche 3%, incubados con la membrana transferida por agitación constante a temperatura ambiente, para detectar la unión antígeno-anticuerpo, se utilizó un segundo anticuerpo anti IgG humana de cabra conjugado con la enzima peroxidasa (IICS-UNA) a una dilución 1:1000 en tampón TBS leche 3%, y revelado con el sustrato DAB (Diamino Bencidina tetrahidrocloride-Sigma-Aldrich) diluido en TBS-Tween 20 y 5uL de peróxido de hidrógeno como catalizador.

ELISA indirecto IgG

Para detectar la reactividad de los antígenos se realizó el ELISA indirecto IgG, para lo cual se sensibilizaron las placas de ELISA con 4 µg por pocillo de cada antígeno. Se incubaron los controles positivo y negativos a una dilución 1/50, para la detección se utilizó un segundo anticuerpo anti IgG humano de cabra conjugado con la enzima peroxidasa (IICS-UNA) y revelado con el sustrato 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammoniumsalt (ABTS) (Sigma-Aldrich). Se realizó la lectura a 405nm.

Análisis de los resultados

Se realizó un registro fotográfico tanto de los geles de poliacrilamida como de las membranas reveladas empleándose el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), y para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageLab 5.2.1 (Bio-Rad, USA).

RESULTADOS

Perfil proteico de los extractos de *T. cruzi*

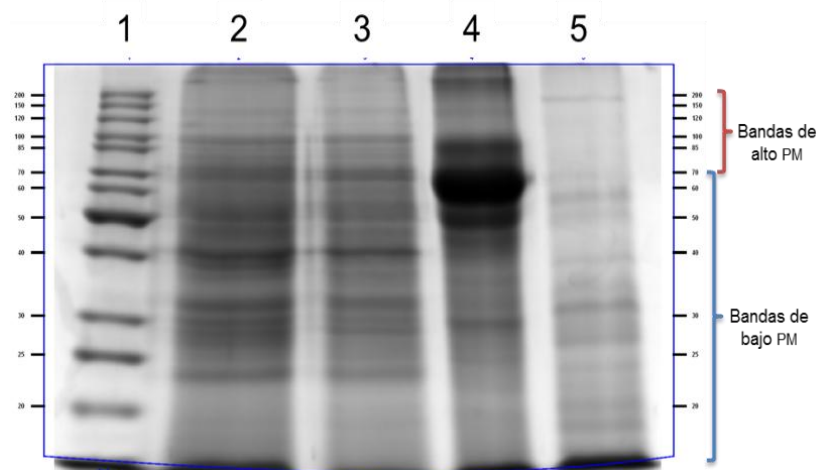
La cuantificación de proteínas de los extractos solubles de las cepas CL Brener, cepa Y Lote 73 y Lote 74 y Py obtenidas fueron del rango de 0,048 a 2,010 mg/mL, siendo el Lote 74 el que presentó mayor concentración. Las concentraciones de proteínas solubles para

cada extracto se muestran en la Tabla 1. Se observó que el extracto de la cepa Py presentó una concentración de proteínas de orden menor que los demás extractos estudiados, por lo que se decidió no incluirlo en el estudio preliminar de funcionalidad antigénica por *Western blot*.

Tabla 1. Concentraciones de proteínas de los extractos analizados

Muestra	Concentración (mg/mL)
Lote 73	0,306 ± 0,135
Lote 74	2,010 ± 0,617
CL Brener	0,640 ± 0,249
Py	0,048 ± 0,006

Se realizó SDS-PAGE para describir cuales de las proteínas identificadas serían las responsables de la capacidad antigénica de cada extracto. Se evaluaron tres extractos, Y lote 73, Y Lote 74, Py y CL Brener. Por medio de la separación por SDS-PAGE de las proteínas presentes en cada extracto de *T. cruzi* obtenido y coloración con azul de Coomassie, se pudo observar un patrón de bandas bastante similar para los extractos Y Lote 73 e Y Lote 74, los cuales diferían a su vez de los obtenidos con los extractos de CL Brener y la cepa Paraguaya (Figura 1).



Carril 1: Marcador de peso molecular proteico (kDa), Carril 2: cepa Y Lote 73, Carril 3: cepa Y Lote 74, Carril 4: clon CL Brener, Carril 5: Cepa Paraguaya (Py). Todas las muestras fueron sembradas en iguales cantidades, con excepción de la cepa Py, cuya concentración de proteínas fue inferior a las demás. Los corchetes indican las bandas consideradas de alto (>70 kDa) y bajo (< 70 kDa) peso molecular (PM).

Figura 1. Perfil de proteínas de los cuatro extractos de *T. cruzi* estudiados.

En la región de proteínas de bajo peso molecular (<70 kDa), sobre todo en el rango comprendido entre 20 y 70 kDa, se observaron bandas comunes entre ambos extractos que podrían corresponder a las mismas proteínas. La mayor cantidad de bandas comunes en 2 o más extractos se observó en la región comprendida entre 24 y 40 kDa (Tabla 2)

El ensayo para evaluar la antigenicidad de los diferentes extractos de *T. cruzi* se realizó por el método de ELISA observándose que todos ellos presentaban reactividad tanto con los controles positivos como con los sueros chagásicos. En el caso de los sueros considerados no chagásicos, dos de ellos presentaron valores superiores pero cercanos al punto de corte con todos los extractos, considerándose por tanto como indefinidos (Tabla 3). Se obtuvieron resultados discordantes con 2 sueros, M6 y M8, los valores de absorbancia fueron cercanos al punto de corte establecido para cada extracto. Para validar los ensayos, se tuvo en cuenta el comportamiento del control negativo, el cual en todos los casos dio absorbancias inferiores al punto de corte.

Se observaron las absorbancias de los sueros chagásicos con el extracto antigénico de Py, valores superiores a las absorbancias obtenidas con los demás extractos en todos los casos, excepto con los sueros controles positivos (Tabla 3).

Tabla 2. Perfil de proteínas de los extractos de *T. cruzi* analizados (*)

Nº de banda	Y Lote 73		Y Lote 74		CL Brener		Py	
	PM ^a	% Int ^b	PM ^a	% Int ^b	PM ^a	%Int ^b	PM ^a	%Int ^b
1	>200	3,1	>200	1,4	> 200	3,4	184,4	4,8
2	137	0,9	140,4	1,2	> 200	1,8	67,5	5,4
3	114,2	0,5	99,4	6,1	135,6	0,4	57,2	12,7
4	97,3	5,3	87,9	2,2	84,9	14,1	51,2	8,4
5	79	3,7	82,4	3,2	62,5	48,0	38,5	5,5
6	73	6,0	71,7	7,4	51	14,9	33,7	10,0
7	70,1	4,9	69,5	5,9	44,6	5,5	31,3	21,8
8	61,1	3,1	61,4	4,7	41	2,4	27	13,9
9	54,9	3,5	55	5,8	35,9	0,4	23,7	3,3
10	52,8	5,5	52,2	3,7	31,8	1,0	20	6,3
11	48	2,4	47	1,9	29,6	3,9	< a 20	7,9
12	40,6	8,5	41,8	11,7	27,2	1,5		
13	38,8	3,5	39,6	2,5	25,3	1,5		
14	37,1	1,4	37,4	1,7	<20	1,2		
15	32,5	10,4	32,9	9,7				
16	30,2	8,9	30,6	6,3				
17	28,8	12,9	29,4	9,1				
18	24	11,6	24,3	11,7				
19	<20	3,9	< a 20	3,8				

*Se señalan en negrita las bandas comunes a dos o más extractos. ^a: Peso molecular de las proteínas detectadas, expresado en kDa; ^b: Intensidad relativa de las bandas detectadas, expresadas en porcentaje. Análisis realizado mediante el software Image Lab 5.2.1.

Tabla 3. Resultados de la evaluación de la antigenicidad de los extractos de *T. cruzi* frente a sueros y controles positivos o negativos para Chagas, mediante ELISA.

Código del suero	Resultado inicial ^a	Lote 73		Lote 74		CL Brener		Py	
		Abs	Res ^b	Abs	Res ^b	Abs	Res ^b	Abs	Res ^b
C II	P	1,426	P	1,326	P	1,339	P	1,030	P
C I	P	0,702	P	0,708	P	0,676	P	0,431	P
C Neg	N	0,083	N	0,104	N	0,113	N	0,066	N
M1 ^c	P	1,424	P	1,376	P	1,386	P	1,634	P
M2 ^c	P	1,390	P	1,434	P	1,296	P	1,561	P
M3 ^c	P	1,389	P	1,482	P	1,275	P	1,542	P
M4 ^c	P	1,413	P	1,466	P	1,386	P	1,571	P
M5 ^c	P	1,372	P	1,321	P	1,350	P	1,636	P
M6 ^d	N	0,341	I	0,346	I	0,320	I	0,266	I
M7 ^d	N	0,236	N	0,219	N	0,253	N	0,241	N
M8 ^d	N	0,538	I	0,464	I	0,402	I	0,518	I
M9 ^d	N	0,205	N	0,193	N	0,281	N	0,130	N
Puntos de corte		0,283		0,304		0,314		0,266	

^a:Resultado de origen para Chagas según exámenes previos realizados en otros laboratorios. ^b:Resultado según ELISA realizado en el Departamento de Producción. ^c: Sueros chagásicos. ^d: Sueros no chagásicos. En negrita se señalan los resultados discordantes entre estudios previos vs. resultados del ELISA con los extractos ensayados. P: Positivo, N: Negativo, I: Indefinido.

Se realizó la inmunodetección de las proteínas de los diferentes extractos de *T. cruzi* transferidas a una membrana de Inmobilon-P, previamente resueltas en el gel de poliácridamida. Se observó reacción en cada uno de los extractos con el suero control positivo (Figura 2 A), mientras que al emplear el suero control negativo no se observó

reacción, a excepción del extracto de CL Brener, el cual presentó dos bandas de bajo peso molecular inmunogénicas (< 70 kDa) (Figura 2 B).

La reacción del suero control positivo frente a las proteínas antigénicas de los tres extractos ensayados con este método fue apreciable, observándose un reconocimiento antigénico a lo largo de cada carril. Se destacaron las bandas de pesos moleculares aproximados de 18, 38 y 48 kDa, compartidas por los extractos de Y Lote 73 y 74, además de las de 19, 20 y 25 kDa, comunes para los tres extractos.

Por otro lado, las bandas observadas en la reacción del suero control negativo frente al extracto de CL Brener corresponderían a las de 51 kDa y a una banda de gran grosor en la zona comprendida entre 75 y 135 kDa. No se observó reconocimiento antigénico de la proteína mayoritaria de CL Brener de 62,5 kDa (Figura 2 B).

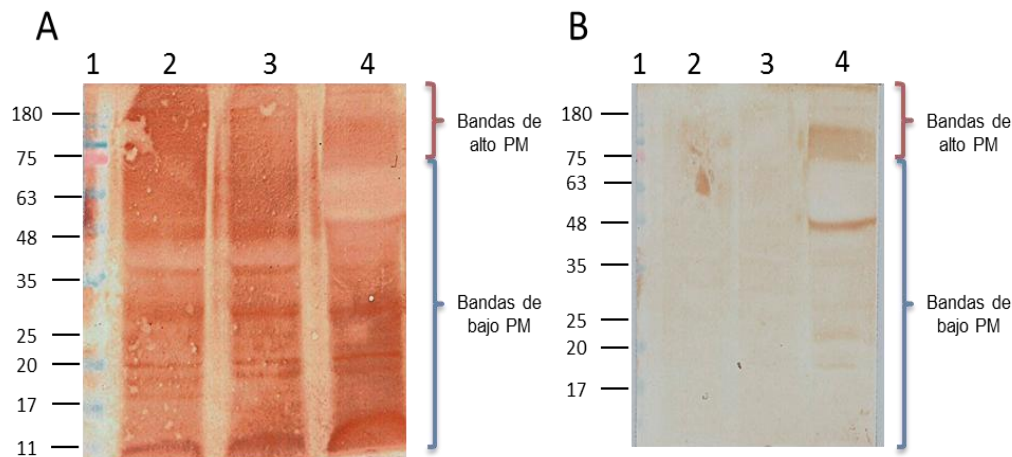


Figura 2: Inmunoblot de extractos proteicos de cepas de *T. cruzi*.

A: reacción con un suero chagásico, **B:** reacción con suero no chagásico.

Carril 1: Marcador de peso molecular proteico (kDa), Carril 2: cepa Y Lote 73, Carril 3: cepa Y Lote 74, Carril 4: clon CL Brener. Se indican con corchetes las bandas de alto y bajo peso molecular, correspondientes a >70 kDa y <70 kDa, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los extractos de las cepas Y Lote 74, Lote 73 y CL Brener partieron de una concentración de parásito mayor, sin embargo, en el caso de la cepa Py, el extracto se encontraba conservado en seroteca desde el 2011 por lo que probablemente haya sufrido la degradación de sus proteínas por el prolongado tiempo de almacenamiento.

La fracción cepa Py presenta proteínas de reconocimiento inmunitario 51,38,31,27, 23 kDa, que coinciden dentro del rango reportado por Riera y col como 100% presentes en los enfermos de Chagas (18). Las bandas de 41 y 32 kDa, presentan de mayor proporción con respecto a las demás observadas, siendo las diferencias en cuanto a las intensidades entre extractos probablemente por distintos niveles de expresión en las diferentes cepas.

Se esperaba encontrar una marcada diferencia en cuanto al patrón de bandas de los extractos de Y Lote 73 y 74 debido a las condiciones de mantenimiento diferentes sin embargo esto no fue observado en su totalidad coincidiendo con otros estudios (19,20).

Se pudo observar variabilidad entre los mismos en la zona de bandas de alto peso molecular (>70 kDa). Estudios previos han reportado similitud con estos resultados (19), aunque no se observa una concordancia exacta de pesos moleculares con los hallados en esta investigación. Esto podría explicarse por las diferencias intrínsecas entre corridas electroforéticas y baja exactitud al asignar pesos moleculares, incluso empleando *softwares* de análisis de imágenes.

Al contrastar el perfil proteico de los extractos de Y Lote 73 y 74 con los de las demás cepas estudiadas, se observó una diferencia mayor en los patrones de bandas. En el caso del clon CL Brener, el cual no sólo consiste en una cepa diferente, sino también en otra UTD (TcVI), se observó una banda mayoritaria de peso molecular aproximado de 62,5 kDa, que correspondió a casi el 50% del total de la intensidad relativa de las bandas observadas y no estuvo presente en los demás extractos.

La cepa Py, por su parte, fue sembrada en el gel en una cantidad menor, por ser su concentración inferior con respecto a las de los demás extractos empleados. Sin embargo,

se observaron tenues bandas de proteínas, mayoritariamente de peso menor a 70 kDa, destacándose las de 31, 27, 57 y 33 kDa por su mayor porcentaje relativo.

Es muy importante mencionar que en la enfermedad de Chagas el diagnóstico no debe estar basado solamente en un método, sino que el resultado debe necesariamente ser confirmado con otro método basado en un principio diferente, como recomienda la OMS (17). Esto obedece a una elevada proporción de resultados discordantes por la falta de estandarización de técnicas apropiadas de detección (21,22), y debe tenerse aún más en cuenta en países coendémicos para *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (23) como lo es el nuestro, por la ocurrencia de reacciones cruzadas. Además, el método de detección previo de las muestras de la seroteca, realizado por otros laboratorios, pudo haber sido elaborado con una cepa o fracción antigénica diferente, o bien los antígenos empleados en este estudio están reaccionando de manera inespecífica con sueros de pacientes que no están infectados con *T. cruzi*.

Los sueros de pacientes paraguayos infectados con *T. cruzi* presentaban mayor respuesta inmune frente a una cepa de circulación local, reconociendo probablemente un mayor número de epítomos de la misma con una variedad mayor de anticuerpos. Esta tendencia no se reprodujo en el caso de los sueros controles positivos, probablemente debido a que los mismos fueron seleccionados de acuerdo a su reacción con la cepa Y que es la que se emplea para la preparación de los kits de detección de *T. cruzi* de los cuales forman parte, presentando efectivamente una absorbancia mayor con los extractos que procedían de dicha cepa, Y Lote 73 y 74.

La reacción inespecífica con un suero no chagásico pudo haber tenido lugar por reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos como *Leishmania* spp. o *T. rangeli* (16)

Por otro lado, los extractos de proteínas empleados son extractos crudos, que contienen una mezcla compleja de proteínas solubles de *T. cruzi*, ante los cuales existiría una enorme diversidad de anticuerpos en el suero.

En conclusión, el perfil proteico particular de cada extracto analizado, evidenciado por medio de SDS-PAGE, permitió detectar diferencias en cuanto a las cepas, particularmente entre las que pertenecían a unidades taxonómicas diferentes.

Se comprobó la actividad antigénica de todos los extractos mediante el test con sueros chagásicos y no chagásicos por la técnica de ELISA. En cuanto al perfil antigénico de los extractos de *T. cruzi* mediante *Western blot*, se corroboró la antigenicidad de ciertas proteínas de bajo peso molecular en los extractos al ser testeados con un suero chagásico, además de la observación de reacción inespecífica, sobre todo con proteínas de alto peso molecular, lo que podría optimizarse empleando antígenos más purificados.

Fuente de financiación: Este proyecto fue financiado por el CONACYT a través del Programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia e investigación – FEEI del FONACIDE” proyecto 14-INV-162.

Declaración de conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO/PAHO. La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una epidemia americana ancestral. Dr. P. Albajar-Viñas/Chagas; 2007. 266 p.
2. Weiss LM, Kirchhoff LV. Chagas Disease. Academic Press; 2011. 396 p.
3. World Health Organization (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates [Internet]. 2015 feb p. 33-43. (Weekly epidemiological record). Disponible en: <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>
4. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 24 de junio de 2010;465(n7301_supp):S6-7.
5. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. : 132-8.
6. Sanchez JD. OPS OMS | Información general: Enfermedad de Chagas [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. [citado 29 de noviembre de 2016]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=3591%3AChagas-disease&Itemid=41505&lang=es
7. Ferreras González A, García Cuartero I, Gato Díez A, Ferreras Fernández P. Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis

- africana. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado*. abril de 2014;11(54):3194-207.
8. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. noviembre de 2009;104(7):1051-4.
 9. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. marzo de 2012;12(2):240-53.
 10. Zingales B, Pereira MES, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, et al. Biological Parameters and Molecular Markers of Clone CL Brener - The Reference Organism of the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. noviembre de 1997;92(6):811-4.
 11. Aria L, Acosta ME, Guillen Y, Rojas A, Meza T, Infanzón B, et al. ELISA Chagas test IICS V.1 evaluation for the diagnosis of Chagas disease. *Mem Inst Investig En Cienc Salud*. diciembre de 2016;14(3):7-13.
 12. Acosta, ME. Desarrollo y Evaluación de una Prueba Inmunocromatográfica para el Diagnóstico de la Infección con *Trypanosoma cruzi*. Universidad Nacional de Asunción; Disponible en : www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-012.pdf
 13. Acosta N, López E, López E. Cepas de *Trypanosoma cruzi* en el Paraguay. *Mem Inst Investig En Cienc Salud*. 27 de julio de 2014;11(2):78-89.
 14. Martínez I, Cervantes-Landín A, Espinoza B. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Gac Médica México*. 2013;149(3):363-5.
 15. Araújo AB, Berne MEA. Conventional serological performance in diagnosis of Chagas' disease in southern Brazil. *Braz J Infect Dis*. abril de 2013;17(2):174-8.
 16. Gil J, Cimino R, López Quiroga I, Cajal S, Acosta N, Juárez M, et al. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y leishmaniasis. *Med B Aires*. abril de 2011;71(2):113-9.
 17. WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000 : Brasilia B, Organization WH. Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee. Control de la enfermedad de Chagas: segundo informe del comité de expertos de la OMS [Internet]. 2002 [citado 30 de enero de 2017]; Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42443>
 18. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, et al. Identification of a Western Blot Pattern for the Specific Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Human Sera. *Am J Trop Med Hyg*. 1 de marzo de 2012;86(3):412-6.
 19. Puerto FI, García Escalante MG, Ehrenberg Enriquez J. Estudio del perfil antigenico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de conejos. *Rev Bioméd - Univ Autónoma Yucatán*. 1996;7(3):133-45.
 20. Lima D, Rita A, Arévalo P, Bastidas V, Bolívar ML, Navarro MC, et al. Efecto de las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. *Salus*. 2007;11:20-6.
 21. Reiche EM, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. noviembre de 1998;59(5):750-6.
 22. Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, et al. Excretory-Secretory Antigens of *Trypanosoma cruzi* Are Potentially Useful for Serodiagnosis of Chronic Chagas' Disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1 de septiembre de 2001;8(5):1024-7.
 23. Vega Benedetti AF, Cimino RO, Cajal PS, Juárez MDV, Villalpando CA, Gil JF, et al. Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Trop Med Int Health TM IH*. septiembre de 2013;18(9):1103-9.